

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-507344

(P2003-507344A)

(43)公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51)Int.Cl.⁷
A 6 1 K 47/48
9/72
38/22
47/32
47/34

識別記号

F I
A 6 1 K 47/48
9/72
47/32
47/34
47/36

テマコート[®] (参考)
4 C 0 7 6
4 C 0 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-516573(P2001-516573)
(86) (22)出願日 平成12年8月7日(2000.8.7)
(85)翻訳文提出日 平成14年2月6日(2002.2.6)
(86)国際出願番号 PCT/KR00/00868
(87)国際公開番号 WO01/012230
(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)
(31)優先権主張番号 1999/33984
(32)優先日 平成11年8月17日(1999.8.17)
(33)優先権主張国 韓国(KR)

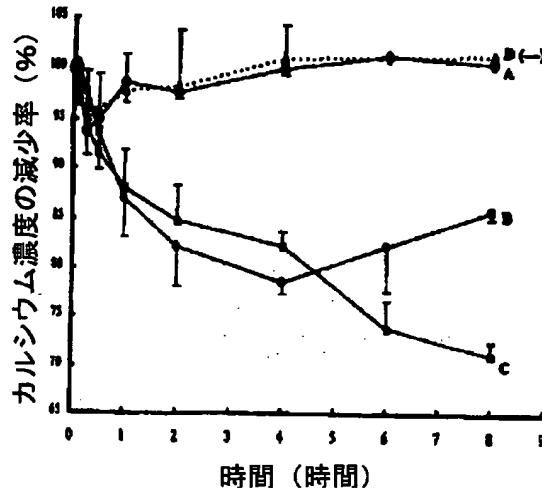
(71)出願人 パク, ミュングーオク
大韓民国, ソウル 139-230, ノウォン
グ, ハギエードン, ハクエオウル チュン
ギュ アパート シャープ107-1403
(71)出願人 リー, カング, チューン
大韓民国, ソウル 135-010, カングナム
ーク, ナンヒエオンードン 86-12
(72)発明者 パク, ミュングーオク
大韓民国, ソウル 139-230, ノウォン
グ, ハギエードン, ハクエオウル チュン
ギュ アパート シャープ107-1403
(74)代理人 弁理士 八田 幹雄 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体適合性ポリマーと接合されたペプチドの経鼻粘膜デリバリー

(57)【要約】

本発明は、生体適合性ポリマー生物学的に活性のあるペプチド接合体からなる、経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物に関するものである。本発明の薬剤組成物は、水に難溶性である、ペプチドの水溶性を増加させ、プロテアーゼによる分解から保護することによって安定性を改善し、その結果、薬剤の投与回数を減らして薬剤の乱用によって誘導される副作用を抑制する。加えて、本発明の薬剤組成物は鼻腔を介してデリバリーされるので、薬剤の活性を短期間で発現することができ、生物学的利用能を改善する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的に活性のあるペプチドが活性のある生体適合性ポリマーと接合されてなる経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項2】 ペプチドは、カルシトニン、副甲状腺ホルモン（PTH）、インシュリン、合成エンケファリン、成長ホルモン放出ペプチド（GHRP）、黄体ホルモン放出ホルモン（LH-RH）及びその誘導体、視床下部の分泌物質、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）、甲状腺刺激ホルモン、ならびに胸腺液性因子（TGF）よりなる群から選択される、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項3】 生体適合性ポリマーは、200～20,000の分子量を有する、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項4】 生体適合性ポリマーは、500～12,000の分子量を有する、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項5】 生体適合性ポリマーは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキシエチレン（POE）、ポリトリメチレングリコール、ポリ乳酸及びその誘導体、ポリアクリル酸及びこれらの誘導体、ポリアミノ酸、ポリビニルアルコール類、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリ（L-リジン）、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ならびに多糖、デキストラン等の水溶性ポリマー、ならびにポリビニルアルコール及びポリアクリルアミド等の非免疫原性ポリマーよりなる群から選択される一種である、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項6】 ペプチド及び活性のある生体適合性ポリマーのモル比は、1：1～1：7である、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項7】 ペプチド及び活性のある生体適合性ポリマーの反応pHは、5.0～8.0である、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項8】 1分子のペプチドに1～3分子の活性のある生体適合性ポリマーが接合する、請求項1に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項9】 1分子のカルシトニンに1～3分子のPEGが接合する、請求項8に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【請求項10】 PEGは、カルシトニンのN-末端、Lys¹⁸またはLys¹¹で接合する、請求項9に記載の経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の属する技術分野**

本発明は、水に難溶性である、生物学的に活性のあるペプチドが、活性のある生体適合性ポリマーと接合されてなる、経鼻粘膜デリバリー(nasal transmucosal delivery)用の薬剤組成物に関するものである。

【0002】

より詳しくは、本発明は、水溶性がかなり改善され、プロテアーゼによる分解から保護される、経鼻粘膜デリバリーへの使用に適する生体適合性ポリマー-生物学的に活性のあるペプチド接合体(conjugate)を含む薬剤組成物に関するものである。

【0003】

本発明の経鼻粘膜デリバリー用のペプチド-ポリマー接合体からなる薬剤組成物は、薬剤の活性を短時間で発現でき、生物学的利用能が改善される。

【0004】**発明の背景**

体内では、ホルモンやサイトカインのような様々な形態として存在する、多様なペプチドが重要な役割を果たしている。遺伝子工学が最近非常に進歩したことにより、様々なペプチドを大量に合成して、医薬品として使用することができるようになった。

【0005】

しかしながら、医薬品としてのペプチドまたはタンパク質の使用には、多くの問題点がある。第一に、ペプチドまたはタンパク質は、体内に取り入れられた後短期間で容易に加水分解あるいは酵素によって分解するため、体内への吸収効率が極めて低い。さらに、このようなペプチド医薬品は繰り返して投与されると、免疫反応がしばしば誘導されて、医薬品の生理学的な活性に対して中和する役割として作用する、投与されたものの生命を脅かすほど重篤な過敏症を引き起こすような抗体を産生する。加えて、細網内皮系組織(RES)によるクリアランスが増加する。したがって、大部分のペプチド医薬品は、現在まで注射によって投

与されてきた。しかしながら、注射による投与は、患者に苦痛を与え、危険を伴う。特に、長期間治療が必要な患者は、かれら自身を注射によって処置することができない。ゆえに、ペプチドの他の投与経路を開発する必要性が残っている。

【0006】

成人の鼻腔は、2.0～4.0 mmの厚みの粘膜で覆われ(Mugind, Nasal Allergy, Blackwell Scientific, Oxford, 1979)、約20 mlの体積を有する。鼻腔は、微細な絨毛が多く、吸収表面積が大きいため、薬剤の活性を短期間で発現させることができる。したがって、薬剤の経粘膜(transmucosal)デリバリーに関して広範な研究がなされてきた。粘膜を介した薬剤の吸収に影響を与える因子としては、薬剤固有の透過率、イオン強度、流量分配係数(flow distribution coefficient)及び分子量等の、薬剤の物理学的及び化学的特性、担体の輸送、プロテアーゼによる分解、ならびに鼻粘膜の生理学的な状態が挙げられる。事実、鼻粘膜は、薬剤が、経口投与時の体内での薬剤の利用の大きな障害である、肝臓での代謝を回避しうる直接的な吸収経路である。ゆえに、経鼻粘膜経路は、薬剤の体内での利用を有意に向上できる点で経口経路に比して利点を有する。

【0007】

高分子量のペプチドまたはタンパク質の経鼻粘膜デリバリーは、ペプチドまたはタンパク質が鼻粘膜をよく通過できないため、静脈内注射に比べて吸収効率が低い。ペプチドの吸収を改善する吸収促進剤が示唆されてきた。示唆された吸収促進剤の例としては、界面活性剤(Hirai et al, Int. J. Pharm. 9, 165-169, 1981)、アシルカルニチン、コリンエステル、 α -シクロデキストリン、キレート化剤(Lee, In: Delivery Systems for Peptide Drugs, Plenum, New York, pp. 87-104, 1986)がある。しかしながら、これらの吸収促進剤は、配合時の薬剤の安定性を下げたり、または鼻粘膜を刺激するもとなるため、実用化が難しい。

【0008】

薬剤の経鼻粘膜デリバリーに関して、多くの研究結果が特許に開示される。

【0009】

・ 欧州特許第23,359号および第122,023号は、ペプチド薬剤の粉末製剤が鼻粘膜を介してデリバリーされる可能性を公開する。米国特許第4,25

0, 163号には、薬剤の経鼻粘膜デリバリーを促進するために粉末形態のペプチド薬剤と混合される粘膜吸収性物質が開示される。欧州特許第123,831号は、鼻粘膜を介したステロイドの投与に関するものである。ドイツ特許第2,620,446号には、インシュリンの経鼻粘膜デリバリーに有効である体内吸収促進剤が記載される。

【0010】

PCT/GB/86/00721号には、鼻粘膜を介してデリバリーされうるミクロスフェア中への薬剤の配合技術が開示される。しかしながら、この配合技術は、特定の薬剤にのみ適用できる。

【0011】

特開昭58-189118号公報には、シクロデキストリンがペプチドの経鼻粘膜デリバリーに利用される。特開昭59-89619号公報には、経鼻粘膜デリバリーの中性吸収促進剤として、エーテル性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテルが開示される。しかしながら、これらの界面活性剤は、鼻粘膜を損傷するため、臨床での使用には適さない。

【0012】

特開昭61-118325号公報には、カルシトニンの経鼻粘膜デリバリーに使用される塩基性または中性のアミノ酸が記載される。特開昭63-39822号公報では、ショ糖脂肪酸エステルが薬剤の経鼻粘膜デリバリー用の吸収促進剤として使用される。しかしながら、これらの吸収促進剤はまた、粘膜に毒性がある。

【0013】

ほとんどがペプチド薬剤の一様の放出に基づく、上記引用特許により、薬剤を連続的に放出できるが、粘膜を介して投与されるペプチドまたはタンパク質薬剤が短期間で分解するという問題を解決できない。これらの公知の技術は、ペプチド薬剤の経鼻粘膜デリバリーに適用するには困難がある。

【0014】

合成高分子への製薬上活性のあるタンパク質または分子の接合は、インビボ(*in vivo*)またはインビトロ(*in vitro*)に適用される際に多くの利点を提供する。

高分子に共有結合すると、生理学的に活性のある分子は、表面特性および溶解性が変化する。例えば、水または有機溶剤での溶解性が増加する。さらに、高分子の存在は、接合したペプチドをインビボ(*in vivo*)でより安定にし、さらに、腸管システム、腎臓、脾臓および／または肝臓によるクリアランスを減少する。ゆえに、ペプチドへのポリマーの接合により、溶液でのペプチドの安定性を非常に改善でき、さらにペプチドの固有の表面特性を効果的に保護して、非特異的なタンパク質の吸着を防止できる。

【0015】

米国特許第4, 179, 337号には、ペプチドまたはポリペプチドの生物学的な活性を維持する一方、抗原性及び抗免疫性が抑制された、ペプチドまたはポリペプチドと500～20, 000の分子量を有するポリエチレングリコール（以後、「PEG」とする）または水溶性ポリマーとの接合体が開示される。米国特許第4, 301, 144号には、ヘモグロビンが、PEGまたは水溶性ポリマーと結合すると酸素分子を運搬する能力が増加することが記載される。

【0016】

様々なタンパク質が、PEGと接合すると、半減期の延長及び血漿中での免疫原性の抑制を示すことが報告される(Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7, 175-186, 1984)。ウリカーゼ-PEG接合体は、インビボ(*in vivo*)での半減期が増加し、尿酸の代謝中の副作用の抑制を示すことが示される(Davis et al., Lancet, 2, 281-283, 1981)。

【0017】

前記特許から明らかなように、PEGの接合によって、生物学的に活性のあるペプチドまたはタンパク質は、インビボ(*in vivo*)での半減期及び溶解性を増加させ、免疫反応を抑制することができる。

【0018】

非常にしばしば、ポリペプチドへのPEGの接合は、活性化されたPEGをポリペプチドのアミノ酸残基に反応させることによって達成される。リジン残基及びN-末端がこの目的に使用されるのに適する。PEGの活性化に関しては、PEGの一方の水酸基をメチルエーテル基に置換し、他方の水酸基を求電子性の官

能基に結合させる(Abuchowski, A. and Davis, F.F. (1981), in *Enzymes as Drugs* (Holsenborg, J. and Roberts, J., eds))。活性化されたポリマーの例としては、アミド結合を有する、PEG-N-ヒドロキシスクシンイミドー活性化エステル類、アルキル結合を有する、PEG-エポキシド類及びPEG-トレシレート(tresylate)、ウレタン結合を有する、PEG-カルボニルイミダゾール及びPEG-ニトロフェニルカーボネート類(nitrophenyl carbonates)、N-末端にシップ塩基を有する、PEG-アルデヒドが挙げられる。

【0019】

ポリペプチド配列では、リジン残基はランダムに位置するので、PEGが非特異的にポリペプチドに結合する。均一なPEG-ペプチド接合体を得るために、PEGを、システイン残基、オリゴ糖、水酸基、アルギニン基等のターゲット部位に結合するという試みがなされてきた。

【0020】

ポリペプチドのシステイン基に特異的に反応することができるPEG誘導体の例としては、PEG-ビニルスルホン(vinyl sulphone)、PEG-ヨードアセトアミド(iodoacetamide)、PEG-マレイミド、及びPEG-オルソピリジルジスルフィド(orthopyridyl disulfide)が挙げられ、マレイミドを含むPEGが最も好ましい。PEG-ビニルスルホンは水溶液中での安定性の点で最良であり、また、PEG-オルソピリジルジスルフィドは、ジスルフィド結合の存在によりインビボ(in vivo)で可逆的に分解されうる。これらの誘導体の利点をもつペプチドとしては、インターロイキン-3及びインターロイキン-2がある。

【0021】

ポリペプチドのオリゴ糖に特異的に反応性を有するPEG誘導体としては、アルデヒド含有化合物と反応して比較的安定なヒドロゾン(hydrozone)結合を形成できる、PEG-ヒドリジド(hydrazide)がある。糖タンパク質の糖部位へのPEG-ヒドリジドの特異的な結合という利点がある。

【0022】

PEG-イソシアネート類は、ポリペプチドの水酸基と特異的に反応する。PEGをポリペプチドのアルギニン残基に接合するために、グアニジノ基に非常に

反応性のある、フェニルグリオキサールを含むPEG誘導体が使用される。

【0023】

上述したように、ペプチド単独の経鼻粘膜デリバリー(nasal transmucosal delivery)は、ペプチドが肝臓での代謝を受けないため、経口投与に比べて有意に吸収効率を改善するが、内因性の酵素によって分解されるのでペプチドの生物学的利用能に劣る。

【0024】

前記及び他の欠点を克服するために、我々、本発明者らは、難溶性の、生物学的に活性のあるポリペプチドが活性化された生体適合性ポリマーと接合されてなる、経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物を開発した。本発明は、ポリマーペプチド接合体を鼻腔を介して投与すると、水溶性が向上し、プロテアーゼによる分解から保護され、これにより薬剤組成物の医療上の活性をインビボ(in vivo)で長期間維持できることを確認した。

【0025】

発明の要旨

本発明の目的は、経鼻粘膜デリバリーに使用するのに適する生物学的に活性のあるペプチドーポリマー接合体を提供することである。

【0026】

本発明のさらなる目的及び利点は、以下により明らかになるであろう。

【0027】

本発明は、活性化された生体適合性ポリマーと接合されてなる、難溶性の、生物学的に活性のあるポリペプチドを含む、経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物を提供するものである。

【0028】

本発明のさらなる態様は、以下により明らかになるであろう。

【0029】

図面の簡単な説明

図1は、sCT及びPEG-sCTを単離するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すものであり、この際、Aは、トリ-PEG-sCTであり；Bは、

ジ-PEG-sCTであり；Cは、モノ-PEG-sCTであり；Dは、sCTである。

【0030】

図2は、PEGがカルシトニンのN-末端、LyS¹⁸またはLyS¹¹と接合するモノ-PEG-sCTの生成へのpHの効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT(N-末端接合体)であり；□は、モノ-PEG-sCT(LyS¹⁸-接合体)であり；△は、モノ-PEG-sCT(LyS¹¹-接合体)である。

【0031】

図3は、PEGがカルシトニンのN-末端、LyS¹⁸またはLyS¹¹と接合するモノ-PEG-sCTの生成へのカルシトニン:sCTのモル比の効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT(N-末端接合体)であり；□は、モノ-PEG-sCT(LyS¹⁸-接合体)であり；△は、モノ-PEG-sCT(LyS¹¹-接合体)である。

【0032】

図4は、PEGがカルシトニンのN-末端、LyS¹⁸またはLyS¹¹と接合するモノ-PEG-sCTの生成へのカルシトニン:sCTの反応時間の効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT(N-末端接合体)であり；□は、モノ-PEG-sCT(LyS¹⁸-接合体)であり；△は、モノ-PEG-sCT(LyS¹¹-接合体)である。

【0033】

図5は、hPTH及びPEG-hPTH(1-34)を単離するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すものであり、この際、Aは、トリ-PEG-hPTH(1-34)であり；Bは、ジ-PEG-hPTH(1-34)であり；Cは、モノ-PEG-hPTH(1-34)であり；Dは、hPTH(1-34)である。

【0034】

図6は、sCT及びPEG-sCT接合体を鼻腔を介して投与する際の血中カルシトニン濃度の減少効果を示すものであり、この際、Aは、sCTであり；B

は、モノーPEG5000-sCTであり；Cは、モノーPEG2000-sCTであり；Dは、モノーPEG12000-sCTである。

【0035】

図7は、単離されたモノーPEG-sCT異性体のカルシウム減少効果を示すものであり、この際、●は、モノーPEG-sCT（N-末端接合体、M1）であり；■は、モノーPEG-sCT（LyS¹⁸-接合体、M2）であり；◆は、モノーPEG-sCT（LyS¹¹接合体、M3）であり；△は、sCTであり；□は、単離されないモノーPEG-sCT異性体である。

【0036】

好ましい実施態様の詳細な説明

本明細書中に使用される「生体適合性ポリマー」は、水に溶解する自然発生するまたは合成化合物を意味する。例えば、以下に制限されるものではないが、生体適合性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキシエチレン（POE）、ポリトリメチレングリコール、ポリ乳酸及びその誘導体、ポリアクリル酸及びこれらの誘導体、ポリアミノ酸、ポリビニルアルコール類、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリ（L-リジン）、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ならびに多糖、デキストラン等の水溶性ポリマー、ならびにポリビニルアルコール及びポリアクリルアミド等の非免疫原性ポリマーが挙げられる。

【0037】

約200～20,000、好ましくは500～12,000の分子量を有するポリマーが、本発明において使用される。

【0038】

本発明は、活性化されたポリマーを生物学的に活性のあるペプチドに結合することによって調製できる、経鼻粘膜デリバリー用のペプチド-ポリマー接合体を提供するものである。この際、ペプチド及びポリマー間の結合は、共有結合または親油性結合若しくは疎水性結合等の非共有結合であってもよい。

【0039】

本発明のペプチド-ポリマー接合体を調製するにあたって、活性化されたポリ

マーに対するポリペプチドのモル比は、約1:1~1:10、好ましくは1:1~1:7である。加えて、1~3個の活性化されたポリマーを1個のポリペプチド分子に接合してもよい。ペプチドーモノポリマー接合体は、最も有効な薬理活性を発揮する。特に、カルシトニン-PEG接合体の場合には、PEGを、カルシトニンのN-末端および/またはLyS¹⁸および/またはLyS¹¹に接合してもよい。得られたカルシトニン-PEG接合体のうち、PEG1分子がカルシトニン1分子に接合するカルシトニン-(モノ)PEG接合体は、最も高いカルシウム減少効果を発揮する。PEGがN-末端またはLyS¹⁸に接合する接合体異性体は、PEGがLyS¹¹に接合する接合体異性体に比べてより一様でかつ有効なカルシウム減少活性を示す。反応溶液のpHが5、6または7で、80%以上のPEGがカルシトニンのN-末端に接合する。他方で、pH8以上では、PEGは、LyS¹¹及びLyS¹⁸にますます接合していく。これに対して、反応時間及びモル比の変化は異性体の割合に影響を与えることができない。

【0040】

本発明におけるペプチドー活性化ポリマーの結合反応は、数分~12時間、0~25℃の反応温度で、6~9のpHの、0.1Mリン酸緩衝溶液中で行なわれる。

【0041】

ポリマーの活性化方法は、下記段階；ポリマーをモノエトキシポリ(エチレンジリコール、mPEG) [monoethoxy-poly(ethylene glycol), mPEG]等のポリアルキレンオキシド(以下、「PAO」と称する)に調製し；さらに、PAOの他の部分を反応性を有する反応基に変換する段階から構成される。活性化されたポリマーは、リジンのε-アミン基と反応することによってペプチドーポリマー接合体を形成する。リジンのアミン基に加えて、ペプチド内のカルボキシル基、活性化されたカルボニル基、酸化された糖及びメルカブト基が、接合部分として使用できる。

【0042】

本発明者らは、ペプチドーポリマー接合体を鼻腔を介してラットに投与した後の時間によるペプチドの血中濃度を測定した。これにより、本発明者らは、経鼻

粘膜デリバリーによるペプチドは、生体内でより良好な安定性を有し、長期間生物学的な活性を維持することを確認した。

【0043】

本発明のペプチドは、特定の治療剤に限定されず、生物学的な活性を有するすべての物質に適用できる。特に、カルシトニン、副甲状腺ホルモン（以下、「P TH」と称する）、インシュリン、合成エンケファリン、成長ホルモン放出ペプチド（以下、「G H R P」と称する）、黄体ホルモン放出ホルモン（以下、「L H R H」と称する）及びその誘導体、視床下部の分泌物質、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（以下、「C G R P」と称する）ならびに甲状腺刺激ホルモンならびに胸腺液性因子（以下、「T H F」と称する）を使用することが望ましい。

【0044】

カルシトニンは、32個のアミノ酸から構成される1本鎖ペプチドであり、N-末端で環を形成し、C-末端にプロリンアミド(proline amide)基を有する。カルシトニンは、破骨細胞に直接作用することによって骨吸収を阻害し、過カルシウム症(hypercalciumia)、パジェット病、骨吸収による痛みおよび骨粗鬆症の治療に使用される。カルシトニンは、サケ、ウナギ、ヒト、ブタ等で生産され、サケ及びウナギのカルシトニンが最良の効果を有する。

【0045】

副甲状腺ホルモン（P TH）は、84個のアミノ酸から構成されるペプチドホルモンであり、副甲状腺から分泌される。副甲状腺細胞はカルシウム濃度の認識部位を有するので、カルシトニン濃度がより低くなるとP THの分泌が増加し、カルシトニン濃度がより高くなるとP THの分泌が減少する。P THは、小腸で食物から摂取されたカルシウムの吸収を増加させ、カルシウムを骨から血液に輸送し、最終的に血中のカルシウム濃度を増加させる。P THの主要な活性部位は副腎皮質である。P THは、副腎皮質の膜に結合して、cAMP、IP₃（inositol triphosphate）及びDAG（ジアシルグリセロール）の生産を向上する。

【0046】

インシュリンは、A鎖及びB鎖からなるペプチドである。21個のアミノ酸で

なるA鎖及び30個のアミノ酸でなるB鎖は、1対のジスルフィド結合によって連結される。ジスルフィド結合は、A鎖の6番目のアミノ酸とB鎖の11番目のアミノ酸との間に存在する。血糖値が高まると、インシュリンは即座に脾臓から排出される。次に、糖は、インシュリンによってグリコーゲンの形態で貯蔵されることは脂肪若しくはタンパク質の合成用のエネルギー源として使用される。加えて、インシュリンは、カルシウムのホメオスタシスにおいて重要な役割を果たす。インシュリンが高濃度に存在すると、細胞外部から細胞内部へのカルシウムの取り込みが高まり、過カルシウム症(hypercalciumia)が誘導される。

【0047】

エンケファリンは、アヘンと似た作用を示すペントペプチド(pentapeptide)である。エンケファリンは、T r y - G l y - G l y - P h e に結合するC-末端に従ってメチオニンエンケファリン及びロイシンエンケファリンに分類される。エンケファリンは、鎮痛性の神経線維(algesic nerve fiber)の末端からのP物質の放出を防止することによって痛みが脳に伝達されるのを阻害する。

【0048】

成長ホルモン放出ペプチド(G H R P)は、ヘプタ及びヘキサの形態で存在し、成長ホルモンの放出に影響を与える。G H R Pの成長ホルモン放出効果は、投与量に関連し、思春期までは増加し、その以降は減少する。

【0049】

G H R P-6は、H i s - A s p - T r y - A l a - T r y - A s p - L y s - N H₂の構造を有するヘキサペプチド(hexapeptide)であり、5.5~6.0のpHの、酢酸緩衝液(acetate buffer)中で非常に安定である。経口投与の場合には、G H R P-6の生物学的利用能は0.3%であり、吸収半減期は15分であり、消失半減期(elimination half life)は60分である。G H R P-6は、視床下部及び脳下垂体の受容体を介して成長ホルモンを選択的に分泌する。

【0050】

黄体ホルモン放出ホルモン(L H-R H)は、視床下部のペプチドであり、L H及び卵胞刺激ホルモンの放出を刺激する。L H-R Hは、ターゲットとなる細胞表面上の受容体に結合することによって脳及び多くの末梢器官の機能を調節す

る。LH-RHは、Pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂のデカペプチド(decapeptide)構造を有し、腎臓の尿管で分解される。例えば、LHRH誘導体としては、ナファレリン(nafarelin)、ブセシリン(busecillin)、ジリデキシン(zilidexin)等が挙げられる。

【0051】

本発明のペプチドーポリマー接合体を含む経鼻粘膜デリバリー用薬剤組成物は、適合な形態に配合でき、外用適用を目的とする医薬品としてのスプレー(spray)によって主に投与されうる。

【0052】

スプレーの調製では、ペプチドーポリマー接合体を溶剤に溶解、または懸濁し、薬液を低粘性の噴霧剤(spraying agent)と共に特定の噴射装置(バルブ)を備えた容器に充填する。ここでは、薬液は、圧力を利用したスモッグ(smog)のタイプでスプレーされる。容器の材質には、すずめっきをした鉄(tinned iron)及びアルミニウム等の金属が使用される。

【0053】

必要であれば、容器の内面を防虫塗料(moth-proofing painting)で塗布する。内容積が100ml以下の場合には、ガラスまたは合成樹脂製の容器が可能である。噴霧剤(spraying agent)は、通常、圧縮空気及び不燃性の液化ガスである、フレオン(フレオン 11(freon 11)、CC₁₃F; フレオン 12(freon 12)、CC₁₂F; フレオン 114(freon 114)、C₂C₁₂F₄)を使用する。

【0054】

本発明のペプチドーポリマー接合体を含む薬剤組成物の投与量は、0.1μg～10mg/kg/日であり、ペプチドの種類及び患者の症状によって広範囲に変更できる。

【0055】

実施例

本発明の実際の及び現在好ましい実施態様を、下記実施例に示されるように詳細に説明する。

【0056】

しかしながら、当該分野における通常の知識を有するものは、この開示を考慮して、本発明の精神及び概念に含まれるような修飾及び改良をしてよいと解される。

【0057】

実施例1：PEG-sCTの調製

<1-1> PEG5000-sCTの調製

Abuchowski (Abuchowski et al, *Cancer Biochem. Biophys.*, 7, 175-86, 1984) の方法に従って、モノメトキシーポリ(エチレングリコール)を、PEGの1個の水酸基を保護するように、PEG(MW 5000)から調製した。ホスゲン及びN-ヒドロキシスクシンイミドをこれに添加して、スクシニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(succinyl-N-hydroxysuccinimide ester)(以後、「SS-PEG」と称する)の形態で活性化した。活性化されたSS-PEG 4.38mgを、リン酸緩衝溶液(pH 8.0)に溶解して、0.2mlのサケのカルシトニン(以後、「sCT」と称する)(Novabiochem, LA Jolla, CA, USA)(5mg/ml、0.1Mリン酸緩衝溶液、pH 8.0)を添加し、周囲温度で30分間、攪拌した。0.1Mのグリシンを添加して反応を停止した。未反応のカルシトニン及びPEGを、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline)(以後、「PBS」と称する、pH 7.4)を用いた分析によって除去し、PEG5000-sCTを得た。

【0058】

<1-2> PEG12000-sCTの製造

PEG(MW 12000)をスクシンイミジルスクシネート(succinimidyl succinate)で活性化し、活性化されたSS-PEG 9.2mgを用いて、PEG12000-sCTを調製した。全ての過程は、実施例<1-1>に記載されるのと同様にして行なった。

【0059】

<1-3> PEG2000-sCTの製造

PEG(MW 2000)をスクシンイミジルスクシネート(succinimidyl su

ccinate)で活性化し、活性化されたSS-PEG 2mgを用いて、PEG 2000-sCTを調製した。全ての過程は、実施例<1-1>に記載されるのと同様にして行なった。

【0060】

実施例2：PEG-sCTの単離

実施例<1-1>～<1-3>で調製されたPEG-sCT接合体を、0.4ml/分の流速でPBS(pH7.0)を溶出液として用いてサイズ排除カラム(スーパーHR 12/30(Super HR 12/30), Pharmacia LKB, Sweden)によって単離した(図1)。分子サイズに従った時間差としてカラムから単離されたペプチドを、蛍光分光計(Hitachi, Japan)を用いて各ピークに単離した。各々分離された画分を、セントリコン-10(Centricon-10)(Amicon, USA)を用いて濃縮し、冷蔵庫で貯蔵した。

【0061】

図1は、蛍光分光計で測定された各ピークの蛍光強度を表わし、各ピークはサイズ排除カラムから溶出されたものである。

【0062】

図1に示さるよう、3分子のPEGが1分子のカルシトニンと接合して、最も大きな分子サイズを有するトリ-PEG-sCTが、最初にカラムから溶出され、カラムに試料を注入してから30分以内に収集された。トリ-PEG-sCTの後に、ジ-PEG-sCT及びモノ-PEG-sCTが順番に単離された。

【0063】

さらに、PEGと接合したカルシトニン分子は最も小さな分子サイズを有していたので、最後にカラムから溶出し、流出時間は40分以上かかった。この時点で、カラムから溶出された各ピークの蛍光強度を、カラムに直接連結された蛍光分光計で測定し、各ピークを集めた。

【0064】

実施例3：様々なpH、モル比及び反応時間によるPEG-sCTの調製

<3-1> pHによるPEG-sCTの調製

pHが5～9の、0.1Mリン酸緩衝溶液 88.2μlに、それぞれ、6

. 8 μ l のカルシトニン (10 mg/ml) 及び 5 μ l のSS-PEG (60 mg/ml) を添加し、周囲温度で 30 分間、攪拌した。1Mのグリシン 5 μ l を添加することによって、カルシトニン及びSS-PEGの反応を中止した。未反応のカルシトニン及びPEGを、PBS (pH 7.4) を用いた透析によって除去した。

【0065】

<3-2> SS-PEG/カルシトニンのモル比によるPEG-sCTの調製

6. 8 μ l のカルシトニン (10 mg/ml) に、10 μ l のSS-PEG溶液を添加して、1:1、1:2、1:3、1:5及び1:10のモル比のカルシトニン及びSS-PEGの混合物を得、これらの5種の混合物に 78.2 μ l のPBS (pH 8.0) を加えた。これらから、PEG-sCTを、実施例<3-1>におけるのと同様の方法で調製した。

【0066】

<3-3> 反応時間によるPEG-sCTの調製

6. 8 μ l のカルシトニン (10 mg/ml) に、10 μ l のSS-PEG溶液を添加して、1:3のモル比のカルシトニン及びSS-PEGの混合物を得た後、この混合物に 78.2 μ l のPBS (pH 8.0) を加えることによって、5個の同じ反応溶液を調製した。5個のこの溶液を、攪拌しながら 5、10、20、30、60 分間、室温で反応させて、実施例<3-1>に示されるのと同様にしてPEG-sCTを調製した。

【0067】

実施例4：モノ-PEG-カルシトニン異性体の単離

サイズ排除カラムを用いて、実施例<3-1>～<3-3>で調製されたPEG-sCT接合体を、トリ-PEG-sCT、ジ-PEG-sCT及びモノ-PEG-sCTに分離した。この分離は、実施例2と同様にして行なわれた。

【0068】

得られたモノ-PEG-sCTを、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって3種の異性体に分けた。この際、100RP-8 (4.0 × 125

mm、 $5 \mu M$ 、Merck) をカラムとして使用し、ペンタフルオロプロピオン酸 (pentafluoropropionic acid) (P F P A) を含むアセトニトリルの直線的な濃度勾配(linear gradient)を移動相(mobile phase)として使用した。濃度勾配条件は、36～42%の溶媒B (0.1% P F P Aが添加されたアセトニトリル) 及び64～58%の溶媒A (0.1% P F P Aが添加された蒸溜水) を用いて変化させた。定量測定は、UV吸収計(UV absorption meter) (215 nm) または蛍光吸収計(fluorescent absorption meter) (励起280 nm、発光315 nm) を用いて行なった。

【0069】

アミノ酸分析から、このようにして分離された3種のモノ-PEG-sCT異性体は、それぞれ、カルシトニンのN-末端、Lys¹⁸及びLys¹¹に接合したPEGを含むものであると同定されたことが示された。加えて、反応液のpHが5、6または7であると、80%以上のPEGがN-末端に選択的に接合することが見出された。pHが8以上では、PEGは、図2に示されるように、Lys¹¹及びLys¹⁸にますます接合していった。しかしながら、図3及び4に示されるように、反応時間及びモル比を変えても異性体の割合に差異はなかった。

【0070】

実施例5：PEG-PTH(1-34)の調製および単離

<5-1> PEG5000-PTH(1-34)の調製及び単離

50 μlのSS-PEG5000 (23 mg / 0.20 ml、MW 5,000、0.1M PBS、pH 7.0) に、50 μlのPTH溶液 (2.4 mg / 0.15 ml、0.1M PBS、pH 7.0) を添加して、5:1のモル比のSS-PEG5000 : PTHを含む混合物を得た。この混合物を振盪しながら周囲温度で30分間、反応させた。30分間反応させた後、過剰量の0.1Mグリシン溶液を添加して、反応を止めた。未反応の副甲状腺ホルモン及びPEGを、PBSを用いた透析によって除去して、PEG5000-PTH(1-34)を得た。

【0071】

このように調製されたPEG5000-PTH(1-34)接合体を、HPLC

Cシステム及びスーパーdex(superdex)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ここでは、PBS(pH 7.0)を、0.8ml/分の流速で展開溶媒として使用した。溶出された画分は、UV吸光度を測定するまで4℃で貯蔵された。図5に示されるように、UV吸光度は215nmで測定し、蛍光の励起及び発光波長は、280~315nmの範囲に固定した。

【0072】

<5-2> PEG2000-PTH(1-34)の調製及び単離
SS-PEG2000を2mgの量で使用した以外は、実施例<5-1>と同様にして、PEG2000-PTH(1-34)接合体を調製、単離した。

【0073】

実施例6:PEG-GHRPの調製および単離

<6-1> PEG5000-GHRP-6の調製及び単離
50μlのSS-PEG(23mg/0.20ml、MW 5,000、0.1M PBS、pH 7.0)に、50μlのGHRP-6溶液(0.6mg/0.15ml、0.1M PBS、pH 7.0)を添加して、5:1のモル比のSS-PEG:GHRP-6を含む混合物を得た。実施例<5-1>に示されるのと同様にして、PEG-GHRP-6を調製し、さらに単離、精製した。単離されたモノ-PEG-GHRP-6は、即座に凍結乾燥機で凍結乾燥された。

【0074】

<6-2> PEG2000-GHRP-6の調製及び単離
PEG2000を使用する以外は、実施例<6-1>に示されるのと同様の、PEG2000:GHRP-6接合体。

【0075】

実験例7:PEG-LHRHの調製および単離

<7-1> PEG5000-LHRHの調製及び単離
50μlのSS-PEG(23mg/0.20ml、MW 5,000、0.1M PBS、pH 7.0)に、50μlのLHRH溶液(0.5mg/0.1ml、0.1M PBS、pH 7.0)を添加して、1:5のモル比のLHRH:SS-PEGを含む混合物を得た。実施例<5-1>に示されるのと同様にし

て、PEG-LHRHを調製し、さらに単離、精製した。

【0076】

<7-2> PEG2000-LHRHの調製及び単離

PEG2000を使用する以外は、実施例<7-1>に示されるのと同様にして、PEG2000-LHRH接合体を調製し、さらに単離、精製した。

【0077】

実施例8：PEG5000-トリプトレリン(triptorelin)の調製および単離
LHRHの代わりに、LHRH誘導体である、トリプトレリン(triptorelin)を使用する以外は、実施例<7-1>に示されるのと同様にして、PEG5000-トリプトレリン接合体を調製し、単離、精製した。

【0078】

実施例9：PEG5000-オルンタイド(orntide)の調製および単離
LHRHの代わりに、LHRHアゴニストである、オルンタイド(orntide)を使用する以外は、実施例<7-1>に示されるのと同様にして、PEG5000-オルンタイド接合体を調製し、単離、精製した。

【0079】

実験例1：sCT及びPEG-sCTのカルシウム減少効果の比較

S D (Sprague Dawley)のオスのラット (220~300 g, Charles River Japan, Atsugi, Japan) を、45 mg/kg のペプトバルビタール(peptobarbital)を腹腔内に投与することによって麻酔下においてた。気管支及び食道に、PE-250管をおよび大腿動脈にSP-45管をカニュレーション(cannulation)した。20 μl のプラシーボ及び実験薬剤を、ハミルトンシリンジ(Hamilton syringe)でラットの鼻腔に投与した。プラシーボには生理食塩水を使用し、実験薬剤には実施例2から調製されたPEG5000-sCT、PEG12000-sCT、PEG2000-sCT及びsCTを使用した。サケのカルシトニンを、ラット1匹当たり0.05~4.5 IUの量で投与し、ラットを4群に分けた。プラシーボ及び実験薬剤を投与する前、投与してから5、10、30、60、120、240、480及び360分後に200 μl の血液を採取し、すぐに遠心して、100 μl の血漿を得た。血漿中のカルシウム濃度を、カルシウムアッセイ

キット(calcium assay kit)(Sigma, USA)を用いて測定し、投与前のカルシウム濃度を100として、カルシウム残存率を算出した。血漿中の測定されたカルシウム濃度の単位は、mg/dlであり、残存率は、初期値に対する比率(%)として算出された。

【0080】

残存率を各時間に従って算出した後、曲線下面積(area-under the curve)(AUC)を、実験群当たりの各時間での残存率の平均値について算出した。カルシウム濃度の減少率を数式1によって算出し、結果を表1(図6)に表わした。

【0081】

【数1】

<数式1>

$$\Delta D (\%) = (AUC_{Ca-place} - AUC_{Ca-sCT}) / AUC_{Ca-place} \times 100$$

【0082】

ただし、AUC_{Ca-place}は、プラシーポを投与してから960分までのAUCであり、およびAUC_{Ca-sCT}は、カルシトニン及び実験薬剤を投与してから960分までのAUCであった。

【0083】

【表1】

<表1> 各時間での血漿中のカルシトニン濃度の減少率 (n=4)

時間	sCT	PEG5000-sCT	PEG12000-sCT	PEG2000-sCT
0	100%	100%	100%	100%
5	98.9%	100.3%	96.8%	97.9%
10	93.7%	97.7%	96.2%	94.5%
30	95%	93.6%	95.0%	91.5%
60	98.7%	86.9%	97.0%	88.0%
120	97.8%	82.2%	98.4%	84.8%
240	100.3%	73.9%	101.3%	82.2%
480	101.6%	82.3%	-	73.9%
960	101%	85.8%	101.8%	71.2%

【0084】

表1に示されるように、PEGを用いずに接合したカルシトニンのカルシウム濃度は、経鼻粘膜により投与してから1時間減少したが、2時間に元の濃度に回復した。しかしながら、PEGと接合されたカルシトニンを投与した際には、カルシトニン減少効果は、経鼻粘膜により投与してから4時間～8時間、現れた。加えて、カルシウム減少効果は、PEGの分子サイズに従って有意に変化した。

【0085】

すなわち、5,000以下の分子量の場合では、カルシウム減少効果は同様に維持されたが、12,000の場合では、カルシウム減少効果は十分でなかった。この結果は、PEG分子量がより増加するほど、経鼻粘膜による体内への吸収度合いはより減少したことによるものであった。その結果、より低分子量のPEGと接合したカルシトニンは、PEGを用いずに接合されたカルシトニンに比べてより良好なカルシトニン減少効果を有しており、そのカルシウム減少効果は長期間維持された。

【0086】

したがって、本発明のPEG接合体を用いた経鼻粘膜デリバリーは、カルシトニンの使用量及び薬剤の副作用を減少できた。

【0087】

実験例2：モノーPEG-sCT異性体のカルシウム減少効果の比較

実施例4から調製されたモノーPEG-sCT異性体のカルシウム減少効果を、実施例1に記載されるのと同様にして測定した（図7）。

【0088】

図7の結果に示されるように、N-末端及びLys¹⁸でPEGと接合した異性体は、Lys¹¹でPEGと接合した異性体に比べてより良好な一様かつ有効なカルシウム減少効果を表わした。加えて、単離されないモノーPEG-sCTの場合では、N-末端異性体より低いカルシウム減少効果を有するLys¹⁸異性体により、sCTまたはLys¹¹異性体に比してかなりの減少効果が示された。

【0089】

実施例10：PEG2000-GLP-1（グルカゴン様ペプチド）の調製および単離

PEG(MW 2000)をスクシンイミジルスクシネート(succinimidyl succinate)で活性化し、活性化されたSS-PEG 2mgを用いて、PEG2000-GLP-1を調製した。全ての過程は、実施例<1-1>に記載されるのと同様にして行なった。加えて、PEG2000-GLP-1を、実施例<5-1>に記載されるのと同様にして単離、精製した。

【0090】

産業上の利用可能性

本発明の経鼻粘膜デリバリー用のペプチドーポリマー接合体からなる薬剤組成物は、水に難溶性である、ペプチドの水溶性を増加させ、プロテアーゼによる分解から保護することによって安定性を改善し、その結果、薬剤の投与回数を減らして薬剤の乱用によって誘導される副作用を抑制する。

【0091】

加えて、本発明の経鼻粘膜デリバリー用のペプチドーポリマー接合体からなる薬剤組成物は鼻腔を介してデリバリーされるので、薬剤の活性を短期間で発現することができ、生物学的利用能を改善する。

【0092】

当該分野における通常の知識を有するものは、前記説明に開示された概念及び特定の実施態様は本発明の同様の目的を行なうために他の実施態様を修飾するまたは設計するための基礎として容易に利用されると考えるであろう。当該分野における通常の知識を有するものはまた、このような等価な実施態様は添付の特許請求の範囲に記載されるような本発明の精神及び概念を逸脱しないものと考えるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、sCT及びPEG-sCTを単離するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すものであり、この際、Aは、トリ-PEG-sCTであり；Bは、ジ-PEG-sCTであり；Cは、モノ-PEG-sCTであり；Dは、sCTである。

【図2】

図2は、PEGがカルシトニンのN-末端、LyS¹⁸またはLyS¹¹と接合するモノ-PEG-sCTの生成へのpHの効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT(N-末端接合体)であり；□は、モノ-PEG-sCT(LyS¹⁸-接合体)であり；△は、モノ-PEG-sCT(LyS¹¹接合体)である。

【図3】

図3は、PEGがカルシトニンのN-末端、LyS¹⁸またはLyS¹¹と接合するモノ-PEG-sCTの生成へのカルシトニン:sCTのモル比の効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT(N-末端接合体)であり；□は、モノ-PEG-sCT(LyS¹⁸-接合体)であり；△は、モノ-PEG-sCT(LyS¹¹接合体)である。

【図4】

図4は、PEGがカルシトニンのN-末端、LyS¹⁸またはLyS¹¹と接合するモノ-PEG-sCTの生成へのカルシトニン:sCTの反応時間の効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT(N-末端接合体)であり；□は、モノ-PEG-sCT(LyS¹⁸-接合体)であり；△は、モノ-PEG-sCT(LyS¹¹-接合体)である。

G-sCT (LyS^{11} 接合体) である。

【図5】

図5は、hPTH及びPEG-hPTH (1-34) を単離するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すものであり、この際、Aは、トリ-PEG-hPTH (1-34) であり；Bは、ジ-PEG-hPTH (1-34) であり；Cは、モノ-PEG-hPTH (1-34) であり；Dは、hPTH (1-34) である。

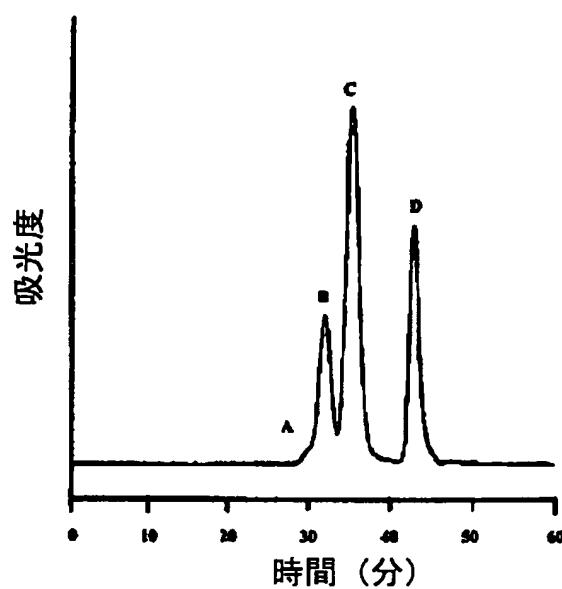
【図6】

図6は、sCT及びPEG-sCT接合体を鼻腔を介して投与する際の血中カルシトニン濃度の減少効果を示すものであり、この際、Aは、sCTであり；Bは、モノ-PEG5000-sCTであり；Cは、モノ-PEG2000-sCTであり；Dは、モノ-PEG12000-sCTである。

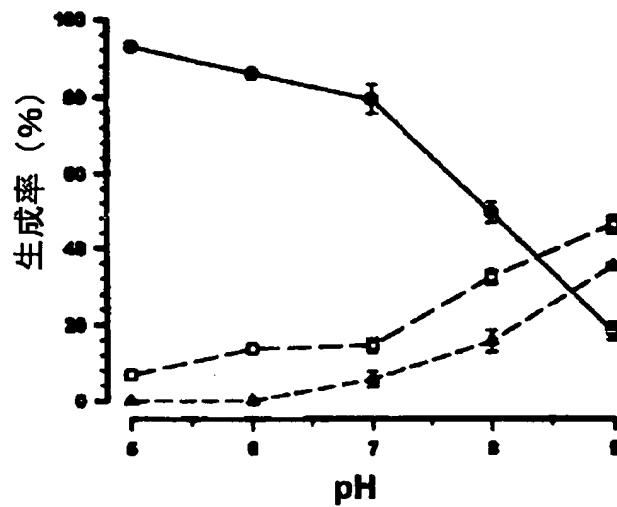
【図7】

図7は、単離されたモノ-PEG-sCT異性体のカルシウム減少効果を示すものであり、この際、●は、モノ-PEG-sCT (N-末端接合体、M1) であり；■は、モノ-PEG-sCT (LyS^{18} -接合体、M2) であり；◆は、モノ-PEG-sCT (LyS^{11} 接合体、M3) であり；△は、sCTであり；□は、単離されないモノ-PEG-sCT異性体である。

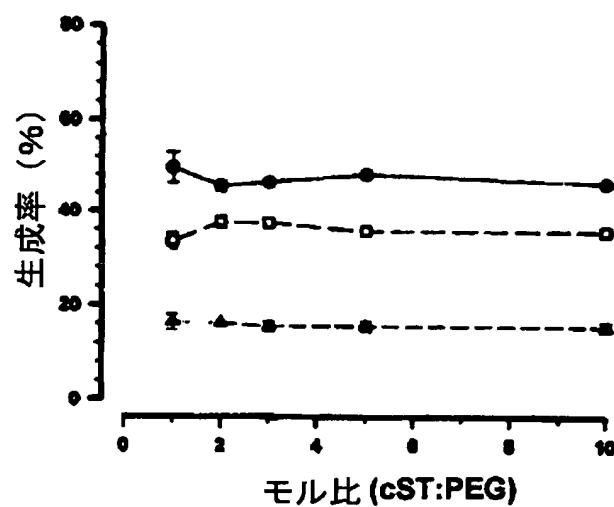
【図1】



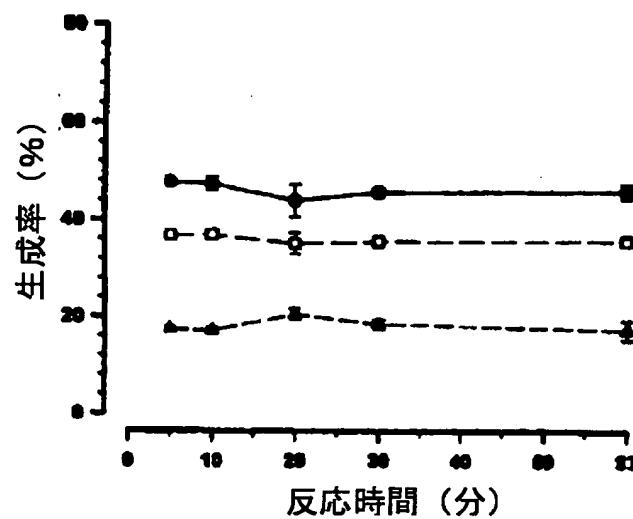
【図2】



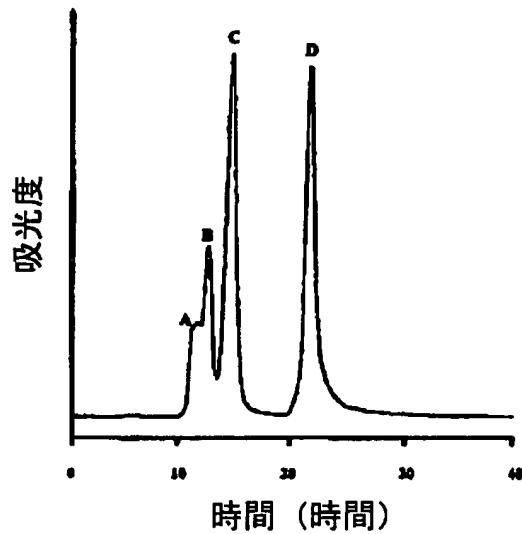
【図3】



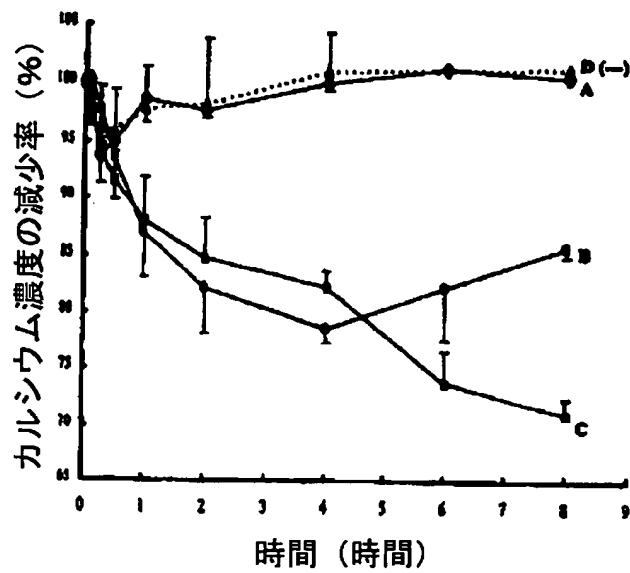
【図4】



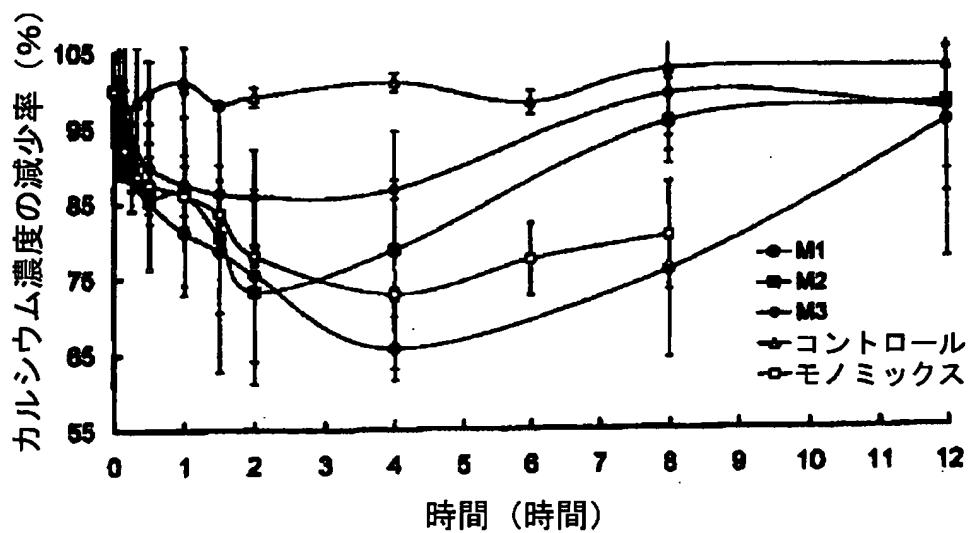
【図5】



【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		international application No. PCT/KR00/00868
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 A61K 47/30 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 47/30		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA Online		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9852614 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LEELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 26. November 1998 (26. 11. 98)	1-10
A	US 5359030 (Protein Delivery Inc.) 25. October 1994 (25. 10. 94)	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reasons (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 SEPTEMBER 2000 (29.09.2000)	Date of mailing of the international search report 30 SEPTEMBER 2000 (30.09.2000)	
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Industrial Property Office Government Complex-Taejon, Dunsan-dong, So-ku, Taejon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer YOON, Kyung Ae Telephone No. 82-42-481-5609	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International application No. PCT/KR00/00868
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9852614 A2	26. 11. 98	AU 9875938 A1 EP 975370 A2	11. 12. 98 02. 02. 00
US 5359030	25. 10. 94	WO 9426778 A1 CA 2162366 AA EP 707596 A1 JP 08510255 T2 US 5438040 A US 5681811 A	24. 11. 94 24. 11. 94 24. 04. 96 29. 10. 96 01. 08. 95 28. 10. 97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.*	識別記号	F I	マーク(参考)
A 61 K 47/36		A 61 K 37/24	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ , CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG , ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM , DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT , LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR , TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者 リー, カング, チューン 大韓民国, ソウル 135-010, カングナム -ク, ナンヒエオンドン 86-12			
F ターム(参考) 4C076 AA11 AA16 AA93 BB25 CC30 EE06 EE09 EE17 EE20 EE30 EE59 FF15 FF63 FF67 FF68 4C084 AA03 AA30 DB01 DB09 DB31 DB32 DB34 MA05 MA16 MA21 MA59 NA03 NA06 NA10			